

酸胁迫对虎纹蛙红细胞及血红蛋白的影响

邵 晨¹, 施时迪², 谢建芳¹

(1. 浙江师范大学化学与生命科学学院生物科学系, 浙江 金华 321004; 2. 浙江台州学院生命科学与医药化工学院, 浙江 临海 317000)

摘 要: 采用室内水族箱培养方法, 研究了不同酸梯度对虎纹蛙 (*Rana tigerina rugulosa* Wiegmann) 红细胞和血红蛋白的影响。结果表明, 在 pH3.5 ~ pH5.0 之间, 酸胁迫对虎纹蛙的红细胞数量及血红蛋白含量具有较明显的剂量效应, 其中 pH3.5 条件下对虎纹蛙红细胞和血红蛋白产生了较强的毒害作用, 并且随着时间的推移对红细胞及血红蛋白的影响呈现逐渐加重的趋势。随着 pH 值的上升, 其红细胞数量和血红蛋白含量也逐渐增大。pH 值 \geq pH5.5 可能是虎纹蛙较为适宜的水体环境。试验表明, 酸胁迫可对虎纹蛙造成较为严重的危害, 可将虎纹蛙红细胞数量和血红蛋白含量的变化作为检测水体酸污染的指标和手段。

关键词: 酸胁迫; 红细胞; 血红蛋白; 虎纹蛙

中图分类号: X503.225 文献标识码: A 文章编号: 1672-2043(2005)01-0039-04

Influence of Erythrocyte (RBC) and Hemoglobin (Hb) in Tiger Frog *Rana tigerina rugulosa* Wiegmann Under of Acid Stress

SHAO Chen¹, SHI Shi-di², XIE Jian-fang¹

(1. Department of Biology, Academy of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; 2. School of Life Science, Pharmaceutical and Engineering, Taizhou University, Linhai 317000, China)

Abstract: The influence of erythrocyte (RBC) and hemoglobin (Hb) in different consistencies to wild Tiger Frog *Rana tigerina rugulosa* Wiegmann) under acid stress was researched in this study. To do the test, several tiger frogs were captured from the Mountain Nanshan in Jinhua and the Mountain Kuocangshan, respectively, in Taizhou, Zhejiang Province, China. For the experiment, five testing groups were exposed under different acid concentrations from pH3.5 to 5.5 (tap water, adjusting the pH with 0.05 mol · L⁻¹ H₂SO₄ and 0.1 mol · L⁻¹ NaOH) and one control (water only, pH \geq 6.5) were utilized in laboratory. The blood samples of two experimental animals from every group were obtained after 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h, separately, and the numbers of RBC and the contents of Hb in the tested animals were tested. The results indicate that the influence of acid stress towards the number of RBC and the contents of Hb exhibited harmful effects between pH3.5 and pH5.0, and especially much poisonous effect at pH3.5. The effects of acid stress to RBC and Hb in the frogs became more and more significant as the exposure period prolong. The number of RBC and the contents of Hb gradually augmented as pH raised, suggesting that pH \geq pH5.5 be the suitable environment to *Rana tigerina rugulosa* Wiegmann. From the results of the test above, the acid stress was more harmful to tiger frog *Rana tigerina rugulosa* Wiegmann. In the mean time, variations of the numbers of RBC and the contents of Hb of the animal may be regarded as an index and a means of testing acid pollution in water. The tiger frog is beneficial to agriculture, so it's very important to prevent harming this animal from acid stress in environmental protection.

Keywords: acid stress; erythrocyte (RBC); hemoglobin (Hb); tiger frog *Rana tigerina rugulosa* Wiegmann

两栖动物因其特殊的生物学特征 (如渗透性皮

肤, 水陆两栖性等), 使得它们极易受到环境污染的影响, 尤其是酸雨等的影响。各种环境污染对两栖动物基因、性别、代谢速率、能量的储存与分配、生长发育等都造成了很大影响^[1]。因此, 两栖动物在受到环境中诸多因素改变的影响后将导致其野生资源量的急剧下降^[2-4]。另据美联社(2000年4月13日纽约)报

收稿日期: 2004-06-14

基金项目: 浙江省自然科学基金(M303128)

作者简介: 邵 晨(1962—), 男, 浙江金华市人, 浙江师范大学化学与生命科学学院副教授, 研究方向为保护生物学、动物学。

E-mail: sky86@mail.zjnu.net.cn

道,全球两栖类动物的总数从1960年至1966年间每年下降了1.5%,之后以每年2%的下降速度一直持续到1997年。

虎纹蛙(*Rana tigerina rugulosa* Wiegmann)属于两栖纲、无尾目、蛙科、虎纹蛙属。曾较为广泛地分布于华东、华中、华南和西南各省^[5]。目前,由于生态环境的变化及人们过度地捕捉,以致野生资源日益枯竭,有些地区野外已不见其踪影^[6],处于濒危状态,属国家Ⅱ级重点保护野生动物。

血液中的红细胞(RBC)和血红蛋白(Hb)主要与动物的呼吸作用有关。红细胞和血红蛋白作为两项重要的生理指标,可用于检测各种不良环境因子对动物的压力作用^[7-8]。近年来,有研究报道pH值对鱼类或人红细胞及血红蛋白方面的影响^[7-12],而两栖动物的相关研究尚少见。本研究主要探讨酸胁迫对虎纹蛙红细胞数量及血红蛋白含量的影响,通过测定这两项生理指标的变化情况,以检测和了解不同酸梯度下对虎纹蛙这一珍稀濒危物种的危害,为更好地保护虎纹蛙野生资源、开展人工养殖提供基础。同时,也可进一步了解环境污染对虎纹蛙的胁迫及毒害作用。

1 材料和方法

1.1 试验器材药品及配制

水族箱(玻璃缸),pH计,注射器,血细胞计数板,血红蛋白吸管,2 mL移液管,洗耳球,表面皿(培养皿),显微镜,血红蛋白计7.01,玻棒,载玻片,盖玻片,滤纸,0.05 mol·L⁻¹ H₂SO₄,0.1 mol·L⁻¹ NaOH,0.1 mol·L⁻¹ HCl,蒸馏水,红细胞稀释液[NaCl 0.5 g(维持渗透压),Na₂SO₄ 2.5 g(使溶液比重增加,红细胞均匀分布,不易下沉),HgCl₂ 0.25 g(固定红细胞并防腐),蒸馏水加至100 mL]。

1.2 试验材料选取及试验方法

试验用虎纹蛙捕自浙江金华南山和台州括苍山。选取大小相似、健壮、活泼、无损伤虎纹蛙84只,雌雄兼用。平均体重(59.3±2.1)g。于水族箱内预养24 h后开始试验。设1个对照组(自来水)及5个试验组(自来水,再分别配以不同的pH值:3.5、4.0、4.5、5.0和5.5)(据浙江省金华市自来水公司提供的检测报告表明,自来水水质符合国家饮用水标准,其中pH值≥6.5),每组投放虎纹蛙14只。试验期间,每天用pH计测定水样的pH值1次,并用0.05 mol·L⁻¹ H₂SO₄和0.1 mol·L⁻¹ NaOH校正。每组于24、48、72、96、120、144、168 h后各取2只动物,用注射器心脏取

血,取血后作标记放回各组的水族箱,不重复取血。试验期间均不喂食。

试验组pH值设置的主要依据:浙江省金华市环保部门等提供的近3年来水环境水质监测资料显示,水质pH值为6.0~8.0,其中局部水域水质的最低pH值<4.0。

1.3 红细胞计数(血细胞计数板)

1.3.1 采血与稀释

用2 mL移液管吸取3.98 mL红细胞稀释液放入表面皿内,用血红蛋白吸管吸血至20 mm³处,将血液吹入表面皿,吸上清夜冲洗沾在壁管上的血液,将吸管洗净,表面皿轻轻摇匀1~2 min。

1.3.2 计数

低倍镜下计数。数计数板中央大方格的四角的4个中方格和中央的1个中方格(共5个)的红细胞总数。对横跨刻度上的细胞,计数遵循“数上不数下,数左不数右”的原则进行。如各中方格的红细胞数目相差20个以上,表示细胞分布不均匀,必须把稀释液摇匀后重新计数。取稀释液3次,得平均值。

1.3.3 计算

将5个中方格内数得的红细胞总数乘以10 000,即得每mm³血内红细胞总数。因为:

(1)稀释液3.98 mL加入血20 mm³,使血液稀释了200倍。

(2)在计数室内只计数0.02 mm³(即一个中方格的容积为0.2×0.2×0.1=0.004 mm³,5个为0.02 mm³),换算成每mm³应乘以50。

1.4 血红蛋白含量测定(沙利氏比色法)

原理:在一定量的血液中,血红蛋白经少量盐酸作用,使亚铁血红素变成高铁血红素,呈现较稳定的棕色。用水稀释后与标准色比较,求出每100 mL血液中所含血红蛋白克数。操作步骤为:

(1)用滴管加0.1 mol·L⁻¹ HCl于血红蛋白稀释管内,到刻度20处。

(2)用血红蛋白吸管吸取血液至刻度20 mm³处(0.02 mL),用滤纸片或棉球擦净吸管口周围的血液,将吸管插入血红蛋白稀释管的盐酸内,轻轻吹出血液至管底,反复吸入并吹出,洗涤多次,使血液完全洗入盐酸内,用小玻棒搅匀后,放置10 min,使盐酸与血红蛋白充分作用。

(3)把稀释管插入标准比色架两色柱中央的空格中,使无刻度的两侧面位于空格的前后方,便于透光和比色。

(4) 用滴管向稀释管内逐滴加入蒸馏水(每加一滴要搅拌),边滴边观察颜色,直至颜色与标准玻璃色柱相同为止。稀释管上液面刻度读数即为每 100 mL 血液血红蛋白的克数。

2 结果与分析

2.1 红细胞数量

显微镜观察,虎纹蛙的红细胞呈椭圆形,胞内有一椭圆形细胞核。镜下可看到少数变形的红细胞,有刺状或圆球状突起。

24、48、72、96、120、144、168 h 各时间段后各组红细胞数见表 1 和图 1。

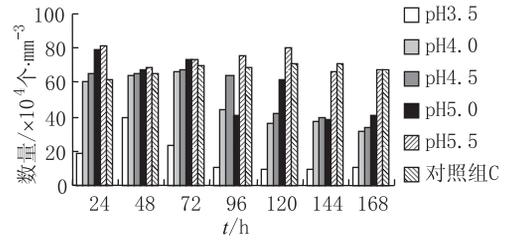


图 1 各时间段各组红细胞数

Figure 1 The number of RBC in different group at different period

表 1 各时间段各组红细胞数(个·mm⁻³)

Table 1 The number of RBC in different group at different period(个·mm⁻³)

时间	平均值 ± 标准误差					
	pH3.5	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	C
24 h	18.84 ± 0.11 × 10 ⁴ **	60.17 ± 0.47 × 10 ⁴	64.71 ± 0.50 × 10 ⁴	78.77 ± 0.58 × 10 ⁴	81.83 ± 0.65 × 10 ⁴	61.50 ± 0.53 × 10 ⁴
48 h	39.93 ± 0.19 × 10 ⁴ **	63.43 ± 0.46 × 10 ⁴	65.38 ± 0.49 × 10 ⁴	67.25 ± 0.52 × 10 ⁴	68.25 ± 0.54 × 10 ⁴	64.92 ± 0.50 × 10 ⁴
72 h	23.35 ± 0.13 × 10 ⁴ **	66.34 ± 0.46 × 10 ⁴	67.79 ± 0.53 × 10 ⁴	72.88 ± 0.55 × 10 ⁴	73.38 ± 0.57 × 10 ⁴	69.59 ± 0.59 × 10 ⁴
96 h	10.21 ± 0.06 × 10 ⁴ **	43.87 ± 0.38 × 10 ⁴ **	64.23 ± 0.51 × 10 ⁴	40.98 ± 0.25 × 10 ⁴ *	75.22 ± 0.61 × 10 ⁴	68.27 ± 0.60 × 10 ⁴
120 h	9.67 ± 0.03 × 10 ⁴ **	36.23 ± 0.31 × 10 ⁴ **	41.57 ± 0.37 × 10 ⁴ *	61.39 ± 0.49 × 10 ⁴	80.12 ± 0.63 × 10 ⁴	70.43 ± 0.62 × 10 ⁴
144 h	9.55 ± 0.04 × 10 ⁴ **	37.12 ± 0.30 × 10 ⁴ **	40.11 ± 0.38 × 10 ⁴ *	38.16 ± 0.28 × 10 ⁴ *	66.22 ± 0.55 × 10 ⁴	71.02 ± 0.61 × 10 ⁴
168 h	10.43 ± 0.05 × 10 ⁴ **	31.71 ± 0.26 × 10 ⁴ *	33.65 ± 0.26 × 10 ⁴ *	40.67 ± 0.27 × 10 ⁴ *	67.43 ± 0.53 × 10 ⁴	67.33 ± 0.59 × 10 ⁴

注: * 表示与对照组(C)差异显著(P < 0.05); ** 表示与对照组(C)差异极显著(P < 0.01)。

从表 1 和图 1 可知,在 pH3.5 试验组中,红细胞数除 48 h 这一时间段与对照组差异显著外(P < 0.05),其余各时间段均与对照组差异极显著(P < 0.01),其中 144 h 时间段与对照组比较,红细胞数仅为对照组的 13.45%,表明 pH3.5 条件下对虎纹蛙红细胞产生了较强的损害作用。而 pH5.5 试验组的各时间段红细胞数均与对照组无显著差异,表明 pH5.5 可能是虎纹蛙较为适宜的水体环境,这与虎纹蛙产地的水质酸碱度的检测结果 pH ≥ 5.5 相符。其他各试验组在 24、48、72 时间段红细胞数与对照组无显著差异,而在 96、120、144、168 h 时间段红细胞数基本上呈逐步减少的趋势,与对照组差异显著,表明对红细胞的影响随时间加强。

2.2 血红蛋白含量

24、48、72、96、120、144、168 h 各时间段各组血红蛋白含量见表 2 和图 2。

从表 2 和图 2 可知,在 pH3.5 试验组中,24、48、

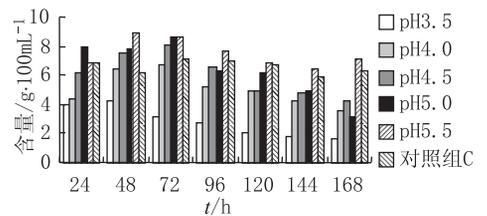


图 2 各时间段各组血红蛋白含量

Figure 2 The contents of Hb in different group at different period (g · 100 mL⁻¹)

表 2 各时间段各组血红蛋白含量(g·100 mL⁻¹)

Table 2 The contents of Hb in different group at different period (g · 100 mL⁻¹)

时间	平均值 ± 标准误差					
	pH3.5	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	C
24 h	4.0 ± 0.10*	4.4 ± 0.11*	6.2 ± 0.028	7.9 ± 0.33	6.9 ± 0.30	6.8 ± 0.29
48 h	4.3 ± 0.11*	6.4 ± 0.30	7.6 ± 0.35	7.8 ± 0.30	8.9 ± 0.38	6.2 ± 0.24
72 h	3.2 ± 0.05*	6.7 ± 0.29	8.1 ± 0.33	8.6 ± 0.32	8.6 ± 0.34	7.1 ± 0.26
96 h	2.7 ± 0.03*	5.2 ± 0.20*	6.6 ± 0.31	6.3 ± 0.28	7.7 ± 0.36	7.0 ± 0.31
120 h	2.0 ± 0.01*	4.9 ± 0.15*	5.0 ± 0.17*	6.1 ± 0.22	6.9 ± 0.27	6.7 ± 0.30
144 h	1.8 ± 0.02**	4.2 ± 0.12*	4.8 ± 0.14*	5.0 ± 0.16	6.5 ± 0.22	5.9 ± 0.21
168 h	1.7 ± 0.01**	3.5 ± 0.06*	4.3 ± 0.10*	3.2 ± 0.06*	7.1 ± 0.26	6.3 ± 0.20

注: * 表示与对照组(C)差异显著(P < 0.05); ** 表示与对照组(C)差异极显著(P < 0.01)。

72、96 h 时间段的血红蛋白含量与对照组差异显著 ($P < 0.05$), 其余 3 个时间段与对照组差异极显著 ($P < 0.01$), 其中 168 h 时间段与对照组比较, 血红蛋白含量只有对照组的 26.98%, 表明 pH3.5 条件下随着时间的推移对虎纹蛙血红蛋白产生了较强至极强的毒害作用。而 pH5.5 试验组的各时间段血红蛋白含量与对照组无显著差异, 同样表明 pH5.5 可能是虎纹蛙较为适宜的水体环境。pH5.0 试验组除 172 h 时间段血红蛋白含量与对照组差异显著外, 其余各时间段血红蛋白含量与对照组无显著差异, 表明 pH5.0 对血红蛋白含量尚未产生较为严重的毒害作用。pH4.0 试验组在 48 h 和 72 h 时间段的血红蛋白含量与对照组无显著差异, 其余时间段的血红蛋白含量与对照组差异显著。pH4.5 试验组在 24、48、72、96 h 时间段血红蛋白含量与对照组无显著差异, 而在 120、144、168 h 时间段血红蛋白含量逐步减少, 与对照组差异显著, 表明对血红蛋白的影响同样也是一个随时间加强的过程。

3 讨论

试验表明, 酸胁迫能较为明显地影响虎纹蛙红细胞数和血红蛋白含量, 并且表现为较明显的剂量效应。pH 值越低对虎纹蛙的酸胁迫作用越强, 并且其毒害作用是一个逐渐深入的过程。酸性水体可通过虎纹蛙皮肤进入体内, 引起血液中的 pH 值降低, 细胞膜对水的通透性增加, 膜外 H^+ 和 H_2O 进入细胞内, 红细胞吸水膨胀, 细胞体积增大, 血红蛋白的含量下降。有理论认为^[19-12], 酸还可使血红蛋白的氧合能力降低及引起血红蛋白构型的变化。首先, pH 值的降低, 导致红细胞变形性极大降低, 使红细胞内氧释放系数减少, 氧分压下降及血红蛋白与氧结合力下降; 其次, 在低 pH 值情况下, H^+ 进入红细胞内, 与带负电的血红蛋白分子结合, 使 $Hb + H^+ = Hb - H^+$ 平衡右移, 降低血红蛋白的 Zeta 电位和血红蛋白稳定性, 引起血红蛋白在红细胞内聚合、沉淀。因此, 酸胁迫对虎纹蛙的毒害作用是极其严重的。

虎纹蛙作为比较稳定可靠的生物防治能手, 是农林害虫的重要天敌, 是一种有益的蛙类, 是农业、林业的益友。因此, 我们应立足于野生动物的保护和人类自身的发展, 尽量减少酸性气体的排放, 减少酸雨的发生, 减少对虎纹蛙的酸毒害, 以有效地保护虎纹蛙这一珍稀濒危动物物种; 同时, 在人工养殖中, 要注意

养殖水体的 pH 值, 以利于虎纹蛙的健康生长, 提高养殖效益。

试验中可能存在的误差分析:

本试验在同一时间段的每组只从两个动物样本中得到两个数据, 由于数据偏少, 造成局部误差。当然, 从保护生物学的角度来讲, 虎纹蛙作为珍惜濒危的国家 II 级重点保护野生动物, 客观上限制了对过多的作为试验动物的伤害。

pH 值可随水温等因素的变化而变化; 在用 NaOH 和 H_2SO_4 调 pH 值时, 还有可能由于溶液酸碱度不均匀, 在测 pH 值时出现偏差; 虎纹蛙的新陈代谢, 其肾小球滤过功能较强, 从血液中滤出的水分可达自身体重的 1/3, 其排出的粪便、尿液也可在一定程度上导致水体 pH 值的变化。

用沙利氏比色法测血红蛋白含量, 存在着视觉误差和读数误差; 而且, 温度和血红蛋白所呈色泽有关, 而在试验过程中, 较难确保室温稳定不变。

参考文献:

- [1] 周 洲, 谢 锋, 江建平, 等. 两栖动物种群衰退研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(1): 128 - 132.
- [2] Wake D B. Declining amphibian population[J]. *Science*, 1991, 253: 860.
- [3] Blaustein A R. The puzzle of declining amphibian population[J]. *Scientific American*, 1995, 272: 56 - 61.
- [4] Beebee T J C. Amphibian decline[J]. *Nature*, 1992, 355: 120.
- [5] 中国生物多样性国情报告编写组. 中国生物多样性国情研究报告[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1998.
- [6] 段 彪, 何 冬, 李 操, 等. 重庆市两栖动物资源及现状[J]. 四川动物, 2000, 19(1): 25 - 28.
- [7] 南旭阳. 铬离子对鲫鱼红细胞核、血细胞数及血红蛋白量影响的研究[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2002, 25(3): 303 - 307.
- [8] 张甫英, 李辛夫. 酸性水对几种主要淡水鱼类的影响[J]. 水生生物学报, 1997, 21(1): 40 - 47.
- [9] 吴 萍, 宋学宏, 蔡春芳, 等. pH 值对黄颡鱼红细胞脆性及血红蛋白含量的影响[J]. 水利渔业, 2002, 22(1): 21 - 23.
- [10] 阮 萍, 黄耀熊, 屠 美, 等. 红细胞在不同 pH 值下膜动力学特性与携氧能力的变化[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(23): 2119 - 2121.
- [11] 姚成灿, 黄耀熊. 单个活态红细胞血红蛋白随 pH 值变化的显微分光光度分析[J]. 中国医学物理学杂志, 2003, 20(4): 243 - 245.
- [12] 姚成灿, 黄耀熊, 李校坤, 等. pH 值对红细胞膜力学特性和胞内蛋白结构与功能的影响[J]. 科学通报, 2003, 48(10): 1050 - 1053.